

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b>  A61K 37/64, C07K 5/02, 7/02	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 90/09191 <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 23. August 1990 (23.08.90)		
<table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP90/00219 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Februar 1990 (09.02.90) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 39 04 040.2      10. Februar 1989 (10.02.89)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SCHRAMM, Wolfgang [DE/DE]; Medizinische Kliniken Innenstadt der Universität München, Ziemssenstr. 1, D-8000 München 2 (DE). SCHRAMM, Hans, J. [DE/DE]; Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> DEUFEL, Paul; Isartorplatz 6/IV, Postfach 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).</td><td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchebericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></td></tr></table>			<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP90/00219 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Februar 1990 (09.02.90) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 39 04 040.2      10. Februar 1989 (10.02.89)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SCHRAMM, Wolfgang [DE/DE]; Medizinische Kliniken Innenstadt der Universität München, Ziemssenstr. 1, D-8000 München 2 (DE). SCHRAMM, Hans, J. [DE/DE]; Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> DEUFEL, Paul; Isartorplatz 6/IV, Postfach 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchebericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP90/00219 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Februar 1990 (09.02.90) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 39 04 040.2      10. Februar 1989 (10.02.89)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SCHRAMM, Wolfgang [DE/DE]; Medizinische Kliniken Innenstadt der Universität München, Ziemssenstr. 1, D-8000 München 2 (DE). SCHRAMM, Hans, J. [DE/DE]; Max-Planck-Institut für Biochemie, Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> DEUFEL, Paul; Isartorplatz 6/IV, Postfach 26 02 47, D-8000 München 26 (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchebericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>			
<b>(54) Title:</b> AGENT FOR INHIBITING SYMMETRICAL PROTEINS, IN PARTICULAR ENZYMES  <b>(54) Bezeichnung:</b> MITTEL ZUR HEMMUNG VON SYMMETRISCHEN PROTEINEN, INSBESONDERE VON ENZYMEN  <b>(57) Abstract</b>  An agent for inhibiting symmetrical proteins, in particular enzymes, in particular for inhibiting HIV protease, consists of structurally symmetrical or almost symmetrical enzyme inhibitors. The molecules of these enzyme inhibitors have a structure with the same symmetry as the molecule of the enzyme to be inhibited or a structure with partly or approximately the same symmetry as the molecule of enzyme to be inhibited, but in any case with sufficient symmetry to ensure inhibition.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Hemmung von symmetrischen Proteinen, insbesondere Enzymen, insbesondere zur Inhibierung der HIV-Protease, in Form von strukturell symmetrisch oder fast symmetrisch gebauten Enzyminhibitoren, das sich dadurch auszeichnet, daß diese Enzyminhibitoren solche sind, deren Molekül in bezug auf das zu hemmende Enzymmolekül strukturell gleich-symmetrisch oder teilweise oder annähernd, jedoch zur Hemmung hinreichend, symmetrisch ist.				

-1-

Mittel zur Hemmung von symmetrischen Proteinen, insbesondere von Enzymen

- 1 Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Hemmung von  
symmetrischen Enzymen, insbesondere zur Inhibierung der  
HIV-Proteinase bzw. Protease, in Form von strukturell  
symmetrisch oder fast oder teilweise symmetrisch gebauten  
5 Enzyminhibitoren.

- Die spezifische Hemmung von Fremdenzymen (aus pathogenen  
Bakterien oder Viren) oder von körpereigenen Enzymen in  
pathologischen Zuständen ist ein wichtiges Anliegen der  
10 Medizin, da sie eine schonende Therapie von Erkrankungen  
erlaubt. Die Erfindung resultiert aus Versuchen, solche  
spezifischen Hemmstoffe für die Immunschwächekrankheit AIDS  
(Acquired Immune Deficiency Syndrome) zu finden. Sie  
erfolgten an der Proteinase, kurz auch "Protease" genannt,  
15 von HIV (Human Immunodeficiency Virus), einem spezifischen  
Enzym der AIDS verursachenden HI-Viren. Dieses Enzym ist für  
die Prozessierung der Vorläuferproteine verantwortlich. Es  
spaltet aus ihnen die fertigen Virusproteine heraus, aus  
denen dann das komplette Virus assembliert wird. Eine  
20 spezifische Hemmung der HIV-Protease sollte die Vermehrung  
der Viren unterbinden und die Symptome kurieren. Die  
Strategie der spezifischen Hemmung der Protease ist bei AIDS  
besonders bedeutungsvoll, da einmal immunologische  
Hemmansätze das Risiko in sich bergen, die restliche  
25 Immunabwehr des Körpers zu zerstören, und andererseits die  
Therapie unter Verwendung der bisher bekannten Hemmstoffe  
der Reversen Transkriptase von HIV (z.B. AZT, FLT, Suramin),  
einem anderen virusspezifischen Enzym, durch schwerste  
Nebenwirkungen beeinträchtigt ist. Auch die Therapie von  
30 AIDS mittels anderer Verbindungen (z.B. der polysulfatierten  
Polysaccharide) ist noch nicht überzeugend demonstriert  
worden oder auch mit schweren Nebenwirkungen belastet.

- Es gibt zahlreiche Literatur über die HIV-Protease, wozu  
35 beispielsweise verwiesen sei auf

1 Es wurde festgestellt, daß strukturell symmetrisch gebaute  
(kurz "symmetrisch" genannte) Enzyminhibitoren besonders gut  
geeignet sind, um die Vermehrung von HI-Viren durch Hemmung  
der symmetrischen (aus zwei identischen Halbmolekülen  
5 bestehenden) viruskodierten Protease zu hemmen. Es wurde  
ferner erkannt, daß auch andere symmetrische Enzyme auf  
diese Weise gehemmt werden können. Symmetrische oder  
teilweise symmetrische Enzyminhibitoren sind bekannt (z.B.  
für eine Reverse Transkriptase, über deren Struktur und  
10 Symmetrie jedoch noch nichts bekannt war), das vorliegende  
Wirkungsprinzip der Zueinanderpassung von Symmetrie des  
Enzyms und Symmetrie des Enzymhemmers jedoch nicht.  
Symmetrische Inhibitoren auf Peptidbasis sind, soweit  
bekannt, bisher nicht beschrieben worden und konnten auch  
15 nicht erwartet werden, da die natürlichen Substrate von  
Enzymen, auch von symmetrisch gebauten, nie symmetrisch  
sind. Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß bei  
solchen Reaktionen (Bindung von unsymmetrischen Substraten  
an symmetrische Enzyme, bzw. Hemmung von symmetrisch  
20 gebauten Enzymen durch unsymmetrische Peptidinhibitoren)  
entweder nur eine - gut passende - Hälfte des Peptids für  
die Bindung verantwortlich ist und die andere Hälfte nur  
eine Hilfsfunktion besitzt oder daß beide Seiten nicht  
optimal passen, aber zusammen eine für die Hemmung  
25 ausreichende Affinität ergeben. Gut passende symmetrische  
Peptide und Peptidderivate (oder andere symmetrische,  
organisch-chemische Verbindungen) sollten hingegen bei  
symmetrischen Enzymen allgemein eine stärkere Bindung (und  
gegebenenfalls Hemmung) vermitteln können als unsymmetrische  
30 Peptide.

Es wurde ferner erkannt, daß aus Untereinheiten bestehende  
Enzymkomplexe - symmetrische wie unsymmetrische - gehemmt  
werden können, wenn der Zusammenhalt der einzelnen  
35 Untereinheiten durch geeignete Verbindungen gestört wird, so

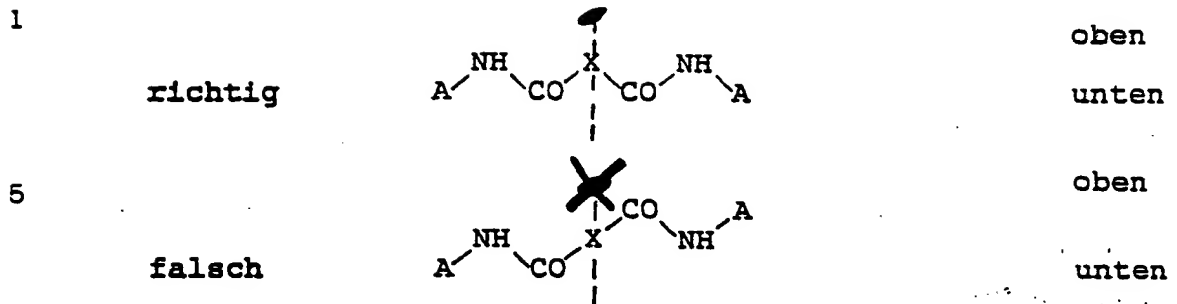
1 Bei AIDS - wie auch bei anderen Krankheiten - sollte die  
hohe Spezifität und Bindungskraft der Inhibitoren eine  
relativ schonende Behandlung erlauben. Dies ist bei AIDS  
5 besonders wichtig, da diese Krankheit eine sehr schonende  
Behandlung benötigt, weil AIDS das Immunsystem schädigt und  
daher die Anfälligkeit des Körpers gegen Krankheiten aller  
Art drastisch zunimmt. Zum anderen wird gerade bei AIDS, das  
nicht kausal kuriert werden kann, da die Virus-Nukleinsäure  
10 in das Genom eingebaut wird, eine lebenslängliche Therapie  
und damit eine sehr schonende und spezifische Behandlung  
nötig sein.

Ein solches Mittel zeichnet sich insbesondere dadurch aus,  
daß das Peptid oder die peptidähnliche Struktur oder die  
15 andere organisch-chemische Verbindung eine zentrale  
organisch-chemische Gruppe aufweist, die der Einfachheit  
halber M genannt werden soll, an die als Seitenketten Reste  
X, Y, Z, U, R gebunden sind, welche organische Reste sein  
können, insbesondere Aminosäuren oder Aminosäurederivate  
20 oder Monosaccharide oder deren Derivate oder Fettsäurereste  
oder ihre Derivate, insbesondere aber Peptide, die jeweils  
gleich oder annähernd gleich und in bezug auf die Gruppe M  
symmetrisch oder annähernd symmetrisch sind, so daß sich  
insgesamt eine symmetrische oder annähernd oder teilweise  
25 symmetrische Verbindung ergibt. Der Begriff "Symmetrie" ist  
hier im üblichen Sinn der Stereochemie zu verstehen, bezieht  
sich bei Proteinen also immer auf eine Drehachse.

Somit können durch solche Hemmstoffe Proteine, insbesondere  
30 Enzyme gehemmt werden, wenn sie zumindest bezüglich des  
hemmbaren Molekülteils eine lokale Symmetrie besitzen. Dies  
sind z.B. Enzyme, die teilweise oder ganz aus gleichen  
Untereinheiten bestehen, obwohl sie zusätzliche  
Untereinheiten besitzen können. Neben HIV-Protease, von der  
35 dies bekannt ist, gibt es auch andere virale Proteine,

- 1 Dies kann z.B. auf folgende Weise erreicht werden:
- 5 a) Wenn die Laufrichtung der Peptidketten in den beiden Hälften verschieden ist, dergestalt, daß in einer Hälfte der NH-CO-Vektor zum Zentrum weist, in der anderen Hälfte vom Zentrum weg, dann muß in einer Hälfte durch Verwendung von Aminosäuren entgegengesetzter Chiralität (D statt L, bzw. umgekehrt) ein Ausgleich geschaffen werden. Der so entstandene Inhibitor ist dann bezüglich der Seitenketten noch annähernd symmetrisch, bezüglich der Peptidbindungen allerdings nicht. Dies genügt aber in 10 aller Regel, daß der Hemmer für das zu hemmende Enzym noch hinreichend symmetrisch ist.
- 15 b) Wenn nicht alle Aminosäuren oder sonstige Reste des Inhibitors symmetrisch sind, sondern z.B. ein Tyrosin auf einer Seite durch ein Phenylalanin ergänzt wird, die restlichen Aminosäuren aber gleich und komplementär sind, ist immer noch mit einer hohen Hemmaktivität zu rechnen. Solche Hemmstoffe können sogar bezüglich der Löslichkeit, 20 Membrangängigkeit und dergleichen günstiger sein als streng symmetrische Verbindungen. Für die Abweichung sind strukturelle und physikalisch-chemische Parameter wie Größe, Ladung, Hydrophilizität und dergleichen, maßgebend. So ist der Inhibitor
- 25 Phe-Thr-Ile-M-Leu-Ser-Tyr  
bezüglich der genannten Eigenschaften "symmetrischer" als  
Ala-Arg-Gly-M-Gly-Asp-Ala (ungleiche Ladung, Arg/Asp)  
oder  
Gly-Gly-Try-M-Gly-Gly-Gly (ungleiche Größe, Try/Gly),  
30 da der Unterschied, z.B. zwischen Thr einerseits und Ser andererseits geringer ist als zwischen Arg und Asp oder zwischen Try und Gly.
- 35

-9-



10 Die folgenden Beispiele zeigen teilweise oder annähernd symmetrische Peptide, die zu einer Hemmung der HI-Viren in H9-Zellen führen.

### BEISPIEL '1

- 15 A) H-(D)-Asn-(D)-Leu-(D)-Thr-Gly-OH  
B) t-BOC-L-Leu-NH-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-COOH  
C) Cl-CH<sub>2</sub>-CO-Gly-Ala-Phe-Pro-Ile-Ala-OH  
D) CH<sub>3</sub>CO-Thr-Leu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-NH-Asn-Leu-Thr-COCH<sub>3</sub>
- 20 E) Ala-Asp-Thr-β-Naphthylamid  
F) CH<sub>2</sub>-(-CH<sub>2</sub>CO-(D)-Asn-(D)-Leu-(D)-Thr-Gly-OH)<sub>2</sub>

Die Verbindungen (a), (b), (c), (d) wurden bei Molaritäten getestet, die von 0,1,µM bis 1000,µM reichten.

25 Infektivitätsversuche wurden wie folgt durchgeführt: Eine  
HIV-1 Suspension mit einem Gehalt an  $10^2$  infektiösen  
Einheiten wurde auf  $5 \times 10^6$  H9 Zellen in einem Volumen von  
1 ml für eine Zeitspanne von 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  absorbiert. Nach  
30 dieser Zeitspanne wurden 9 ml an Gewebekulturmedium, welches  
die geeignete Inhibitorkonzentration enthielt, zugegeben.  
Das Medium wurde jeden Tag gegen frisches Medium plus  
Inhibitor ausgetauscht. Zwei Kontrollkulturen ohne  
Inhibitor wurden mitangesetzt, eine, um den normalen Grad  
der Virusreplikation zu bestimmen sowie eine Kultur mit

35



-11-

1 Acetyl-(D)-Ala-(D)-Val-(D)-Pro-(D)-Phe-(D)-Asn-(D)-Arg-NH<sub>2</sub>

Acetyl-(D)-Gln-(D)-Val-(D)-Ile-(D)-Pro-(D)-Tyr-(D)-Asn-  
(D)-Gln-(D)-Arg-NH<sub>2</sub>

5

Solche Verbindungen können bei sonst sehr substratähnlicher Struktur anstelle der spaltbaren -CONH-Peptidbindung eine nicht oder schwer spaltbare -NECO-Bindung, also mit umgekehrter Richtung, besitzen, z.B. unter Verwendung des retro-inverso-Prinzips unter gleichzeitiger Umkehrung von Laufrichtung der Sequenzen und der Konfiguration der Aminosäuren, z.B. nach den Formeln

10 (D)-A-NHCO-(D)-B-NHCO-(D)-C-NHCO-(D)-D-, anstelle eines natürlichen Substratpeptids der Formel

15 (L)-A-CONH-(L)-B-CONH-(L)-C-CONH-(L)-D-,

wobei die Paare D und A, bzw. C und B, symmetrisch sein oder wenigstens eine strukturelle Ähnlichkeit (bezüglich Hydrophobizität, Ladung, Größe der Seitenketten etc.) zeigen sollen.

20

### BEISPIEL 3

Acetyl-(D)-Arg-(D)-Ala-(D)-Gln-(D)-Leu-NH-CO-CH(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)-CO-  
(L)-Gln-(L)-Ala-(L)-Arg-NH<sub>2</sub>

25

Acetyl-(L)-Arg-(L)-Ala-(L)-Asn-(L)-Leu-NH-CH<sub>2</sub>-CH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-  
CO-(D)-Asn-(D)-Gln-(D)-Leu-NH<sub>2</sub>

30

Acetyl-(D)-Arg-(D)-Ala-(D)-Gln-NH-CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-CO-(L)-Gln-  
(L)-Ala-(L)-Arg-NH<sub>2</sub>

Acetyl-(D)-Arg-(D)-Ala-(D)-Asn-Statin-(L)-Asn-(L)-Ala-  
(L)-Arg-NH<sub>2</sub>

35

1     Statinreste oder zwei verwandte Verbindungen so angeheftet  
werden, daß insgesamt eine räumlich-symmetrische oder  
annähernd symmetrische oder teilweise symmetrische  
Gesamtverbindung entsteht, wie dies auch für Beispiel 4  
5     erläutert ist,

und daß in den verwendeten Verbindungen an eine zentrale  
organisch-chemische Gruppe mit zwei gleichen Substituenten  
zwei Peptide oder peptidähnliche Verbindungen mit gleicher  
10     oder annähernd gleicher und sich entsprechender  
Aminosäuresequenz und gleicher Konfiguration bzw.  
Chiralität, aber mit umgekehrter Laufrichtung der  
Peptidbindungen so angeheftet werden, daß insgesamt eine  
räumlich-symmetrische oder annähernd symmetrische oder  
15     teilweise symmetrische Gesamtverbindung entsteht, wie dies  
auch für Beispiel 7 gezeigt ist,

ferner, daß wie auch in Beispiel 8 gezeigt, in den  
verwendeten Verbindungen an eine zentrale  
20     organisch-chemische Gruppe mit zwei unterschiedlichen  
Substituenten zwei Peptide oder peptidähnliche Verbindungen  
mit gleicher oder annähernd gleicher und sich entsprechender  
Aminosäuresequenz mit gleicher Laufrichtung der  
Peptidbindungen, aber mit umgekehrter Chiralität der  
25     Aminosäuren so angeheftet werden, daß insgesamt eine  
räumlich-symmetrische oder annähernd oder teilweise  
symmetrische Gesamtverbindung entsteht,

und schließlich, daß in den verwendeten Verbindungen an eine  
30     symmetrische oder teilweise symmetrische oder annähernd  
symmetrische Verbindung chemisch reaktive Reste, z.B.  
entsprechend den Formeln  $XCH_2CO-$ ,  $N_2CHCO-$ ,  $NC-CH_2-CO-$ ,  
 $RO_2C-$ ,  $CH_2=CR-$ ,  $RO_nS-$ ,  $HS-$ ,  $RO(H_2N)C^+$  so  
angeheftet werden, daß die Verbindungen von Zielenzym  
35     reversibel oder irreversibel gebunden werden können. Hier

1     BEISPIEL 5

R-Asp-Thr-Gly-R' oder

5     R-Asp-Ser-Gly-R' oder

R-A-Asp-Thr-Gly-B-R' oder

10     Acetyl-Ile-Asp-Thr-Gly-Ala-NH<sub>2</sub> oder

Isovaleryl-Ile-Asp-Ser-Gly-Ala-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> oder

Acetyl-Asp-Thr-Gly-Ala-NH<sub>2</sub>

15     Chloracetyl-Asp-Thr-Gly-Ala-NH<sub>2</sub>

Acetyl-Ile-Gly-Arg-Asn-NH<sub>2</sub>

20     Acetyl-Ile-Gly-Gly-Arg-Asn-Ile-NH<sub>2</sub>

Die verwendeten Verbindungen enthalten die Aminosäuresequenz  
Asp-Thr-Gly oder Asp-Ser-Gly oder verwandte oder ähnliche  
Aminosäuresequenzen oder strukturell ähnliche  
organisch-chemische Reste, die im Zielenzym zur Bildung  
eines funktionellen aktiven Zentrums aus gleichen oder  
entsprechenden Teilen verschiedener Untereinheiten der  
komplexen Enzyme beitragen oder verantwortlich sind, so daß  
die Verbindungen die Struktur oder die Stabilität des  
aktiven Zentrums beeinträchtigen oder die Bildung verhindern  
können.

30

BEISPIEL 6

Acetyl-Thr-Leu-Trp-Gln-Arg-Pro-Leu-Val-NH<sub>2</sub> oder

35

-17-

- 1 -S-S-, -S-, -O-,  
 -CO-CHR-CH(OH)-CHR'-CO-, -NR-NR'-,  
 -NH-CHR-CH(OH)-CHR'-NH-, -NH-CF<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>-NH-,  
 -NH-CF<sub>2</sub>-CO-CF<sub>2</sub>-NH-, -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-,  
 5 -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-, -CO-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CO-, -N(OR)-, -NR-,  
 -P(O)<sub>n</sub>OH-, -CO-CHR-CO-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-NH-, -CO-CH<sub>2</sub>-NR-CH<sub>2</sub>-CO-,  
 -N(C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-CF<sub>2</sub>-CO-CF<sub>2</sub>-N(C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>)-,  
 -N(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-N(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)-,  
 10 -(2S,3S)-NH-CH(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NR-,  
 oder ähnliche Verbindungen, wobei R und R' Wasserstoff oder  
 Aryl- oder Alkylreste bis C<sub>12</sub> bedeuten und n die Zahl 1  
 oder 2 bedeutet.

- 15 In den verwendeten Verbindungen werden an eine zentrale  
 organisch-chemische Gruppe mit zwei gleichen Substituenten  
 zwei Peptide oder peptidähnliche Verbindungen mit gleicher  
 oder annähernd gleicher oder sich entsprechender  
 Aminosäuresequenz und gleicher Konfiguration, aber mit  
 20 umgekehrter Laufrichtung so angeheftet, daß insgesamt eine  
 räumlich symmetrische oder annähernd symmetrische oder  
 teilweise symmetrische Gesamtverbindung entsteht, z.B.  
 entsprechend den Formeln

- (L)-A-CONH-(L)-B-CONH-(L)-C-CONH-M-NHCO-(L)-C-NHCO-  
 25 (L)-B-NHCO-(L)-A oder  
 (L)-C-NHCO-(L)-B-NHCO-(L)-A-NHCO-M-CONH-(L)-A-CONH-  
 (L)-B-CONH-(L)-C oder  
 (L)-A-CONH-(L)-B-CONH-(L)-C-CONH-NHCO-(L)-C-NHCO-  
 (L)-B-NHCO-(L)-A oder  
 30 (L)-C-NHCO-(L)-B-NHCO-(L)-A-NHCO-CONH-(L)-A-CONH-  
 (L)-B-CONH-(L)-C oder  
 (L)-A-CONH-(D)-B-CONH-(L)-C-CONH-M-NHCO-(L)-C-NHCO-  
 (L)-B-NHCO-(L)-A oder  
 (L)-C-NHCO-(L)-B-NHCO-(L)-A-NHCO-M-CONH-(L)-A-CONH-  
 35 (L)-B-CONH-(D)-C oder

1 (D)-A-CONH-(D)-B-CONH-(D)-C-CONH-M-CONH-(L)-C-CONH-  
 (L)-B-CONH-(L)-A, oder  
 (D)-A-NHCO-(D)-B-NHCO-(D)-C-NHCO-M-NHCO-(L)-C-NHCO-  
 (L)-B-NHCO-(D)-A

5 wobei A, B, C Aminosäurereste und M eine zentrale Gruppe darstellen.

Bei den verwendeten Verbindungen wird im Falle von  
 Proteinasen als Zielenzym die Enzymhemmung dadurch erreicht,  
 10 daß sie anstelle der spaltbaren Peptidbindungen eine  
 nichtspaltbare Bindung besitzen, z.B. nach den Formeln  
 -CR<sub>2</sub>-NH-, -CH(OH)-NH-, -CO-N(CH<sub>3</sub>)-, -P(O)<sub>n</sub>-NH-,  
 -(3S,4S)-4-Amino-3-hydroxy-6-methylheptansäure- (Statin),  
 -(3S,4S)-3-Hydroxy-4-amino-5-phenylpentansäure (AHPPA),  
 15 oder ähnliche Verbindungen, wobei R und R' Wasserstoff oder  
 Aryl- oder Alkylreste bis C<sub>12</sub> bedeuten und n die Zahl 1  
 oder 2 bedeutet.

#### BEISPIEL 9

20

NH<sub>2</sub>-Arg-Leu-Asn-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-Asn-Leu-Lys-NH<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>N-(D)-Leu-(D)-Asn-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CO-(D)-Asn-(D)-Ile-NH<sub>2</sub>

25

NH<sub>2</sub>-Leu-Asn-CO-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-CO-Asn-Leu-Arg-OR

NH<sub>2</sub>-Arg-Leu-Asn-CO-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>-CO-Asn-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>

Acetyl-Arg-Leu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-NH-Asn-Leu-Arg-Acetyl

30

H-Leu-Leu-Asn-NH-CHF-CO-CHF-NH-Asn-Leu-Arg-H

Acetyl-Arg-Leu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-NH-Asn-Leu-Arg-Acetyl

35

Acetyl-Arg-Leu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH-Asn-Leu-H

## 1 Beispiele für Zentrale Gruppen:

-NH-CH(OH)-CH(OH)-NH-, -O-, Statin,  
 -NH-CH(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH-,  
 5 -NH-CH(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)-CO-CH(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)-NH-,  
 -NH-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH-,  
 (1S,3S)-NH-CH(Cyclohexylmethyl)-CO-CH(Cyclohexylmethyl)-  
 NH-, 2-Alkylstatin, -CH<sub>2</sub>-, Ethylenepoxid, Thiophen,

## 10 Beispiele für Seitenketten:

Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-, H-His-Pro-His-Tyr-,  
 Ac-Arg-Ser-Gln-His-Cha-, H-Ala-Ala-

## 15 Beispiele für ganze Inhibitoren:

tBoc-Arg-Ser-Gln-His-NR-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NR-His-Gln-Ser-Arg-  
 tBoc,

(R=-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> etc.)

20

H-His-Pro-His-NH-CHR-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NH-His-Pro-His-H  
 (R=-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> etc.)

25

Ac-His-Pro-His-NH-CHR-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-CO-NH-D-His-D-Gln-OCH<sub>3</sub>  
 (R=-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub> etc.)

Ac-Arg-Ser-Gln-Asn-

-NH-CH(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)-CO-CH(CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)-NH-  
 -Asn-Gln-Ser-Arg-Ac

30

(Zentrale Gruppe: 1S,3S; statt CO auch -CH(OH)-, -CO-CO-,  
 -CH(OH)-CH(OH)-, Furan, Ethylenepoxid etc.)

tBoc-His-Pro-Phe-His-Leu-Statin-D-His-D-Phe-D-Pro-D-His- tBoc

35

1 Verbindungen, welche Peptide oder peptidanaloge Strukturen  
enthalten oder von solchen Strukturen abgeleiteten  
Verbindungen bestehen, wobei z.B.  
folgende symmetrische oder teilweise symmetrische  
5 Verbindungen in betracht gezogen werden:  
X-Y-Z-M-Z-Y-X, Z-M-Z, X-Y-Z-Z-Y-X, X-Y-Z-M-Z-Y',  
X-U-Y-X-Z-Z-X-Y'-X, Z-Z-Y-R, R-U-X-Y-Z-M-Z, oder auch nur M,  
wobei X,Y,Z,U,R organische Reste, insbesondere Aminosäuren  
oder Derivate davon, Monosaccharide oder Derivate,  
10 Fettsäurereste oder Derivate, sind, M die zentrale  
organisch-chemische Gruppe darstellt und die beiden  
Strukturen Y, die zu beiden Seiten der zentralen Gruppe  
stehen, strukturell oder in ihren physikalisch-chemischen  
Eigenschaften ähnliche Verbindungen sind, was zusätzlich  
15 oder stattdessen auch für die anderen genannten Gruppen X,  
Z, U oder R gelten kann. Bei guter Passung kann eine  
symmetrische oder fast symmetrische Gruppe M zur Hemmung  
ausreichen, z.B. ein Dipeptidanalogen, wie es auf Seite 20,  
Zeile 18-20 für die Gruppe M von -NH-... bis ...-NH- gezeigt  
20 ist.  
Die Voraussetzung zur Bindung der verwendeten Verbindungen  
an das Zielenzym kann z.B. dadurch geschaffen werden, daß in  
ihnen typische Spaltsequenzen oder Bindungssequenzen der  
natürlichen Substrate oder mit ihnen verwandten Strukturen  
25 oder Strukturen dieser Art verwendet werden, die so  
modifiziert wurden, daß sie dem Zielenzym nicht mehr als  
Substrat dienen und als Inhibitoren wirken. In den  
verwendeten Verbindungen können die Voraussetzungen zur  
Hemmung der Zielenzyme auch dadurch erreicht werden, daß  
30 Substrate oder substratähnliche Verbindungen so modifiziert  
werden, daß sie anstelle der enzymatisch veränderbaren  
Stellen nicht mehr veränderbare Stellen tragen und daher als  
Inhibitoren wirken.

- 1 Gruppen vorhanden sind, die als Zentren der Symmetrie oder  
der annähernden Symmetrie wirken, oder die verwendeten  
Verbindungen besitzen zentrale organisch-chemische Gruppen  
mit zwei identischen oder in ihrer Funktion äquivalenten  
5 organischen Substituenten, die mit zwei identischen oder  
teilweise identischen Peptiden oder peptidähnlichen  
Verbindungen so reagieren können, daß eine symmetrische oder  
teilweise symmetrische Gesamtverbindung entsteht, z.B.  
entsprechend den Formeln  
10 C-CONH-B-CONH-A-CONH-M-NHCO-A-NHCO-B-NHCO-C  
oder  
C-NHCO-B-CHCO-A-NHCO-M-CONH-A-CONH-B-CONH-C,  
wobei A, B, C Aminosäurereste und M eine zentrale  
organisch-chemische Gruppe darstellen. Die verwendeten  
15 Verbindungen können eine symmetrische oder annähernd  
symmetrische zentrale organisch-chemische Gruppe mit zwei  
identischen oder in ihrer Funktion äquivalenten organischen  
Substituenten besitzen, die in der Länge mindestens einem  
Dipeptid entsprechen und mit Peptiden oder peptidähnlichen  
20 Verbindungen so reagieren können, daß eine symmetrische oder  
annähernd symmetrische oder teilweise symmetrische  
Gesamtverbindung entsteht. Falls das oben erstgenannte  
Formelbeispiel (...-NH-M-NH-...) einem guten Inhibitor  
entspricht, muß im zweiten Beispiel (...-CO-M-CO-...) die  
25 Chiralität der verwendeten gleichen Aminosäuren (A,B,C)  
umgedreht werden ("D"-Formen), um eine ähnlich gute Passung  
und damit Hemmung zu erreichen.
- Für den Fall einer zentralen organisch-chemischen Gruppe mit  
30 zwei ungleichen Substituenten, an die zwei gleiche oder  
annähernd gleiche oder sich entsprechende Peptide oder  
peptidähnliche Verbindungen angeheftet sind, seien als  
Beispiele die Formeln  
C-CONH-B-CONH-A-CONH-M-CONH-A-CONH-B-CONH-C  
35 oder



- 1 In den verwendeten Verbindungen kann an ein Peptid oder an  
eine peptidähnliche Verbindung ein Nichtpeptidrest so  
gebunden werden, daß eine annähernd symmetrische oder  
teilweise symmetrische Gesamtverbindung entsteht, z.B. in  
5 bezug auf eine oder mehrere physikalisch-chemische  
Eigenschaften wie Ladung, Hydrophilizität, Hydrophobizität  
oder Größe der Seitenkette bzw. des Restes, oder in den  
verwendeten Verbindungen ist an ein Peptid oder an eine  
peptidähnliche Verbindung oder an ein Peptid mit einer  
10 zentralen organisch-chemischen Gruppe eine Seitenkette oder  
ein Nichtpeptidrest so gebunden, z.B. entsprechend den  
Formeln B-A-M-A-R oder R-B-A-M-A oder R-C-B-A-B-A oder  
B-A-M-R,  
wobei A,B,C,D, Aminosäurereste, M eine zentrale  
15 organisch-chemische Gruppe und R einen organischen Rest  
darstellt, dergestalt, daß insgesamt eine räumlich annähernd  
symmetrische oder teilweise symmetrische Gesamtverbindung  
entsteht, z.B. in bezug auf eine oder mehrere  
physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Ladung,  
20 Hydrophilizität, Hydrophobizität oder Größe der Seitenkette  
bzw. des Restes.  
Es können aber an ein symmetrisches oder teilweise  
symmetrisches oder annähernd symmetrisches Peptid oder eine  
peptidähnliche Verbindung chemisch reaktive Reste, z.B.  
25 entsprechend den Formeln  $XCH_2CO-$ ,  $N_2CHCO-$ ,  $NC-CH_2-CO-$ ,  
 $RO_2C-$ ,  $CH_2=CR-$ ,  $RO_nS-$ ,  $HS-$ ,  $RO(H_2N=)C^+-$ , so  
gebunden sein, daß die Verbindungen vom Zielenzym reversibel  
oder irreversibel gebunden werden können. Auch hier bedeutet  
n die Zahl 1 oder 2 und R ist ein üblicher Esterrest, wie  
30 schon früher angegeben.  
Die verwendeten Verbindungen können auch Aminosäuresequenzen  
der Enzyme oder Proteine enthalten, die für die Assoziation  
ihrer Untereinheiten oder Teilstrukturen oder die Stabilität  
oder strukturelle Anordnung der funktionierenden Enzyme und  
35 Proteine mitverantwortlich sind, oder verwandte oder

1 oder von körpereigenen Enzymen in pathologischen Zuständen,  
durch stabile organisch-chemische Verbindungen gehemmt  
werden, was zur Therapie dienen kann, wenn die verwendeten  
5 Verbindungen Aminosäuresequenzen der strukturell  
unsymmetrischen komplexen Zielenzyme oder verwandte oder  
ähnliche Aminosäuresequenzen oder strukturell ähnliche  
organisch-chemische Reste enthalten, die für die Assoziation  
der Untereinheiten der Enzyme und die Bildung und den  
10 Zusammenhang der funktionierenden Enzymkomplexe  
mitverantwortlich sind, so daß die Verbindungen die Bildung  
oder den Zusammenhalt oder die Stabilität der Enzymkomplexe  
stören und ihre Aktivität beeinträchtigen oder verhindern  
können.

15

20

25

30

35

-31-

1

5

10

15

20

25

30

35

Day post infection	no inhibitor			
	7	8	9	12
HIV Control 1	12401	23708	18921	165540
HIV Control 2	4183	30054	13680	168620
C 1000 $\mu\text{M}$	7646	4308	5343	107640
100 $\mu\text{M}$	3838	6370	8860	96780
10 $\mu\text{M}$	5358	4398	8823	158800
1 $\mu\text{M}$	4575	3198	4186	164240
0,1 $\mu\text{M}$	5561	2314	7477	113340
D 1000 $\mu\text{M}$ - Not tested				
100 $\mu\text{M}$	4393	2663	3022	1533
10 $\mu\text{M}$	4112	5411	2914	210720
1 $\mu\text{M}$	6777	2058	2227	213750
0,1 $\mu\text{M}$	5550	3844	2304	139610

ERSATZBLATT

- 33 -

30 25 20 15 10 5 1

Results: HIV-1 antigen production as measured in antigen capture ELISA, values are o. D. H 9 cells readings.

Day post infection	no inhibitor										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	
HIV Control 1	0,075	0,059	0,068	0,059	0,080	0,182	0,811	0,748	1,052	1,017	
HIV Control 2	0,074	0,062	0,063	0,059	0,053	0,115	0,498	0,698	1,038	1,048	
A 1000 μM	0,087	0,058	0,073	0,054	0,056	0,102	0,286	0,597	0,899	1,054	
100 μM	0,068	0,064	0,065	0,053	0,057	0,070	0,361	0,374	0,915	1,013	
10 μM	0,061	0,075	0,069	0,044	0,064	0,140	0,256	0,499	0,727	1,003	
1 μM	0,064	0,060	0,075	0,057	0,053	0,136	0,213	0,394	0,694	1,065	
0,1 μM	0,060	0,066	0,062	0,055	0,058	0,181	0,363	0,478	0,737	1,037	
B 1000 μM	0,076	0,068	0,050	0,050	0,063	0,075	0,279	0,577	0,811	1,050	
100 μM	0,068	0,070	0,063	0,052	0,052	0,099	0,359	0,260	0,890	0,960	
10 μM	0,063	0,060	0,059	0,047	0,055	0,087	0,303	0,342	0,645	1,038	
1 μM	0,063	0,060	0,061	0,050	0,052	0,105	0,186	0,237	0,745	0,970	
0,1 μM	0,061	0,063	0,039	0,063	0,055	0,149	0,389	0,232	0,700	1,047	
C 1000 μM	0,071	0,053	0,061	0,057	0,123	0,096	0,415	0,778	1,019	1,000	
100 μM	0,064	0,056	0,062	0,053	0,061	0,100	0,265	0,296	0,787	0,940	
10 μM	0,069	0,048	0,066	0,064	0,049	0,099	0,228	0,292	0,643	1,040	
1 μM	0,061	0,054	0,060	0,050	0,051	0,133	0,267	0,239	0,808	1,042	
0,1 μM	0,062	0,069	0,055	0,052	0,054	0,105	0,276	0,336	0,588	1,010	

ERSATZBLATT

1     Patentansprüche

- 5     1. Mittel zur Hemmung von symmetrischen Proteinen, insbesondere Enzymen, insbesondere zur Inhibierung der HIV-Protease, in Form von strukturell symmetrisch oder fast symmetrisch gebauten Enzyminhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß diese Enzyminhibitoren solche sind, deren Molekül in bezug auf das zu hemmende Enzymmolekül strukturell gleich-symmetrisch oder teilweise oder
- 10     annähernd, jedoch zur Hemmung hinreichend, symmetrisch ist.
- 15     2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren organisch-chemische Verbindungen, insbesondere Peptide sind oder peptidähnliche Struktur haben und eine zentrale organisch-chemische Gruppe M aufweisen, an die als Seitenketten organische Reste gebunden sind, insbesondere Aminosäuren oder
- 20     Aminosäurenderivate, Monosaccharide oder deren Derivate oder Fettsäurereste oder ihre Derivate, insbesondere Peptide, die jeweils gleich oder annähernd gleich und in bezug auf die Gruppe M symmetrisch oder annähernd symmetrisch sind.
- 25     3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die Hemmung von Proteinasen die Hemmverbindungen anstelle der spaltbaren Peptidbindungen eine nichtspaltbare Bindung besitzen.
- 30     4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Hemmverbindungen bei sonst sehr substratähnlicher Struktur anstelle der spaltbaren -CONH-Peptidbindung eine nicht oder schwerspaltbare -NHCO-Bindung (also mit umgekehrter Richtung) besitzen.

- 1            enthalten, die im Zielenzym zur Bildung eines  
funktionellen aktiven Zentrum aus gleichen oder  
entsprechenden Teilen verschiedener Untereinheiten der  
komplexen Enzyme beitragen oder verantwortlich sind, so  
5            daß die Verbindungen die Struktur oder die Stabilität  
des aktiven Zentrums beeinträchtigen oder die Bildung  
des aktiven Enzyms verhindern können.
9. Mittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden  
10           Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die verwendeten  
Hemmverbindungen im Falle der HIV-Protease die  
Aminosäuresequenzen Ile-Gly-Arg-Asn,  
Trp-Lys-Pro-Lys-Met-Ile-Gly-Gly-Ile-Gly-  
Gly-Phe-Ile-Lys-Val-Arg; Gln-Ile-Leu-Ile-Glu-Cys;  
15           Val-Gly-Pro-Thr-Pro-Val-Asn; Ile-Gly-Arg-Asn;  
Ala-Gly-Arg-Asn-Leu-Leu-Thr-Gln-Ile oder verwandte oder  
ähnliche Aminosäuresequenzen oder strukturell ähnliche  
organisch-chemische Reste enthalten, die im Zielenzym  
zur Bildung eines funktionellen aktiven Zentrums aus  
20           gleichen oder entsprechenden Teilen verschiedener  
Untereinheiten der komplexen Enzyme beitragen oder  
verantwortlich sind, so daß die Verbindungen die  
Struktur oder die Stabilität des aktiven Zentrums  
beeinträchtigen oder die Bildung des aktiven Enzyms  
25           verhindern können.

30

35

International Application No. PCT/EP 90/00219

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	line 27 - page 122, left hand column	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p>groups in the structure and function of HIV-1 protease as revealed by molecular modeling studies", Seiten 118-122, siehe Seite 121, rechte Spalte, Zeile 27 - Seite 122, linke Spalte, Zeile 7</p> <p>-----</p>	